

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 486 400

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 15242

(54)

Médicaments à base de levures ou de leurs extraits insolubles.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 35/72; C 12 P 1/00.

(22)

Date de dépôt..... 9 juillet 1980.

(33)

(32)

(31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 2 du 15-1-1982.

(71)

Déposant : Société anonyme dite : UNIVABLOT, résidant en France.

(72)

Invention de : Jacqueline Olga Massot et Jacques Noël Astoin.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Armengaud Jeune, Casanova, Akerman, Lepeudry,
23, bd de Strasbourg, 75010 Paris.

La présente invention a pour objet l'application en thérapeutique de levures ou d'extraits insolubles de levures qui ont en commun la même activité pharmacologique et appartiennent aux familles des ascosporogènes, des sporobolomycetaceae et des cryptococcaceae.

A la connaissance de la Demanderesse, le *Saccharomyces cerevisiae* est la seule espèce utilisée en thérapeutique, en particulier comme protecteur ou régénérateur de la flore bactérienne intestinale et en diététique.

Par ailleurs, certains auteurs ont étudié des extraits de *Saccharomyces cerevisiae* ou leurs glucanes dans leur action sur le système réticulo-endothélial (RIGGI et Di Luzio, Am. J. Physiol. (1961) 200, 2, pages 297-300 ou dans leur action antitumorale (HAMURO et coll., CA., (1978) 89, 40 704 b).

Or, les inventeurs ont déjà trouvé que les levures appartenant aux genres *Pichia* et *Hansenula*, ainsi que leurs extraits de glucanes insolubles possèdent des propriétés pharmacologiques spécifiques justifiant leur application en tant que médicaments de maladies infectieuses (voir les demandes de brevets français n° 79.01879 et 80.00890 au nom de la Demanderesse), et on a maintenant pu vérifier que ces propriétés sont générales à l'ensemble des levures appartenant aux familles des ascosporogènes, des sporobolomycetaceae et des cryptococcaceae ainsi qu'à leurs glucanes insolubles.

La présente invention concerne donc un médicament à base de levures ou de leurs extraits insolubles caractérisé par le fait que ces levures appartiennent aux familles des ascosporogènes, des sporobolomycetaceae ou des cryptococcaceae, à l'exception des genres *Saccharomyces*, *Pichia* et *Hansenula*.

La famille des ascosporogènes (*Endomyces* tales) comprend notamment les sous-familles des *dipodascaceae*, des *endomycetaceae*, des *saccharomycetaceae* et des *spermophytaceae*. En ce qui concerne la sous-famille des *saccharomycetaceae*, qui a été plus spécialement étudiée par les inventeurs, l'invention comprend notamment les médicaments à base des levures des genres *Schizosaccharomyces*, *Nadsonia*,

Saccharomycodes, Hanseniaspora, Wickerhamia, Kluyveromyces, Lodderomyces, Wingea, Pachysolen, Citeromyces, Debaryomyces, Schwanniomycetes, Dekkera, Saccharomycopsis ou Lipomyces et plus particulièrement à base de Schizosaccharomyces, Wingea ou Debaromyces, ou de leurs extraits insolubles. L'invention exclut les médicaments à base de Saccharomyces, Pichia ou Hansenula pour les raisons indiquées plus haut.

La famille des sporobolomycetaceae comprend notamment les genres Sporobolomyces, Bullera et Rhodosporidium. L'invention comprend plus particulièrement les médicaments à base de Rhodosporidium ou de leurs extraits insolubles.

La famille des cryptococcaceae comprend la sous-famille des cryptococcoideae à laquelle appartiennent notamment les genres Cryptococcus, Torulopsis, Pitysporum, Brettanomyces, Candida, Kloeckera et Trigonopsis, et les sous-familles des Rhodotoruloideae et des Trichosporoideae, en particulier le genre Rhodotorula. L'invention comprend les médicaments à base de ces levures ou de leurs extraits insolubles.

Toutes ces levures sont connues en tant que telles et sont accessibles dans la plupart des collections de cultures de micro-organismes. On citera ci-après à titre d'exemples quelques espèces de levures ainsi que leurs numéros :

Schizosaccharomyces Pombe	CBS 1042
Wingea	CBS 2934
25 Debaromyces	CBS 4349
Rhodosporidium diobovatum	CBS 6084
Cryptococcus laurentii	CBS 139
Torulopsis	CBS 6380
Brettanomyces bruxellensis	CBS 72
30 Rhodotorula lactosa	ATCC 9536

CBS : Centraalbureau Voor Schimmel Cultures, Delft, Pays-Bas

ATCC : American Type Culture Collection

Les souches de levures utilisables selon l'invention peuvent être entretenues et cultivées de manière connue sur des milieux d'entretien et de fermentation habituellement utilisés pour les levures. Les cellules obtenues
 5 peuvent être séchées à 50° sous vide ou de préférence lyophilisées.

Les extraits insolubles utilisables selon l'invention, qui sont principalement des glucanes insolubles, peuvent être isolés de la paroi des cellules de manière connue,
 10 par exemple selon la méthode indiquée par Bell et Northcote (J. Chem. Soc. (1950), pages 1944-47), éventuellement modifiée, par exemple selon Peat et coll. (idem, 1958a, pages 3862-3868). Le principe consiste à éliminer de la masse cellulaire obtenue par fermentation, d'abord les protéines et
 15 les lipides et les mannanes par traitement alcalin, puis le glycogène et les glucanes solubles par traitement acide.

Les exemples suivants, relatifs à la culture de Wingea et à l'obtention de produits directement utilisables, sont données à titre indicatif.

20 EXEMPLE 1 :

Procédé de fermentation de Wingea

a) Préparation des pieds de cuve.

On prépare le pied de cuve à partir de la culture d'entretien de la souche de Wingea robertsii
 25 Celle-ci est obtenue par incubation pendant 48 heures à 30°C de la levure sur pente gélosée contenant :

Milieu (1)	eau de levure	500 ml
	peptone pancréatique...	2 g
	glucose massé	10 g
30	gélose	18 g
	eau ordinaire q.s.p....	1 litre

On décolle la culture de la pente gélosée par environ 10 ml de sérum physiologique stérile par tube. On verse la suspension ainsi obtenue de manière stérile dans
 35 un erlenmeyer de 6 litres contenant 1,5 litre de milieu de

de fermentation ayant la composition :

5	Milieu (2)	glucose	15 g
		extrait de levure	2,5 g
		sulfate d'ammonium	5 g
		phosphate monopotassique	5 g
		sulfate de magnésium (7H ₂ O)	0,05 g
10		chlorure de calcium ...	0,01 g
		sulfate ferreux (7H ₂ O) ..	0,01 g
		chlorure de potassium ..	0,01 g
		eau ordinaire q.s.p....	1 litre

L'incubation dure 24 heures à 27° ± 1° sur agitateur rotatif à environ 115 t/minute.

b) Fermentation.

On ensemence le contenu de 2 erlenmeyer tel qu'obtenu ci-dessus (environ 3 litres) dans une cuve de fermentation stérile remplie de 200 litres de milieu (2) décrit ci-dessus. On effectue la fermentation pendant 20 heures sous aération de 20 m³/heure. Ensuite on centrifuge le contenu de la cuve afin de récolter la masse contenant les cellules de Wingea.

On obtient 2,77 kg de masse cellulaire (humidité 81%).

EXEMPLE 2 :

Obtention de cellules desséchées.

En séchant à 50°C sous vide 1 kg de la masse cellulaire obtenue dans l'exemple 1, on obtient 295 g de cellules prêtes à être utilisées.

Une variante, pour obtenir un produit plus facile à conserver et à utiliser, consiste à lyophiliser la masse cellulaire obtenue dans l'exemple 1; à partir de 1 kg de masse cellulaire on obtient ainsi 234 g de cellules utilisables.

EXEMPLE 3 :

Obtention de glucanes

On traite 1 kg de masse cellulaire fraîchement centrifugée obtenue selon l'exemple 1, par 3 litres d'une solution de soude à 6 % pendant 1 heure 30 à 80°C ; on recueille le résidu par centrifugation (4000 t/minute pendant 15 minutes) et on traite ensuite par 5 litres d'une solution de soude à 3 % pendant 18 heures à température ambiante ; on centrifuge à nouveau et on traite le produit insoluble de nouveau par une solution de soude à 3 % pendant 1 heure 30 à 80°C. On centrifuge et on reprend le culot de centrifugation par 3 litres d'eau. On amène la suspension ainsi obtenue à pH 4,5 par de l'acide acétique (ou chlorhydrique) et on porte à 80°C pendant 2 heures sous agitation. On lave le résidu obtenu par centrifugation 3 fois par 1 litre d'eau bouillante et reprend par 2,5 litres d'une solution d'acétate de sodium 0,02 M puis procède à un autoclavage à 2 bars pendant une heure.

On lave la partie insoluble à l'eau, puis à l'éthanol, à l'acétone et on sèche sous vide à 50°C maximum. On obtient après broyage du produit obtenu 14,7 g d'une poudre crème.

L'alternative consiste à lyophiliser. A partir de la même quantité de cellules on obtient 13,3 g d'extract. La pureté chimique vérifiée par analyse élémentaire fournit les résultats suivants :

N = < 0,4 % P : absent

L'action de l'amylase d'origine pancréatique sur l'extract ne libère que des traces de composés réducteurs, indiquant l'absence de glycogène.

L'extract utilisable selon l'invention est caractérisé par son insolubilité dans l'eau, les solutions alcalines ou acides, et les solvants organiques usuels, tels que l'éthanol, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme, etc...

On constate toutefois une très légère solubilité dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Infrarouge : le spectre obtenu avec pastille de KBr présente une absorption à 890 cm^{-1} caractéristique des liaisons " β " .

5 Il ressort de ces données que les extraits obtenus de la paroi des levures sont principalement des polymères ramifiés de glucoses, liés par une majorité de liaisons β . L'action de l'hexo- β -(1-3)D) glucanase sur l'extrait libère des composés réducteurs confirmant ainsi l'existence de liai-
10 sons β -(1-3)-D- glucanes. Ces extraits seront appelés simplement "glucanes" dans la suite du texte.

Toutes les levures et leurs glucanes considérés selon l'invention peuvent être obtenus sous forme directement utilisable à la manière décrite dans l'exemple ci-dessus. La
15 pureté des glucanes de chaque levure a été contrôlée par analyse chimique élémentaire permettant de vérifier en particulier l'absence de phosphore et une très faible teneur en azote ($< 0,5\%$).

Les levures et leurs glucanes utilisables selon
20 l'invention ont été soumis à des essais pharmacologiques.

Toxicité.

Aucune toxicité n'a été constatée chez la souris par voie orale pour chacune des levures et leurs glucanes.

Immunostimulation.

25 1) Consommation du complément

L'augmentation de la consommation du complément est le signe d'une stimulation immunitaire.

La technique qui a été utilisée est effectuée in vitro-avec du sérum humain normal titrant 40 UH 50. Les
30 levures ou leurs glucanes sont mis en suspension dans du tampon de MEYER, aux concentrations indiquées dans les tableaux A et B ci-après.

Le dosage du complément est effectué après une incubation de 15 minutes à 37°C du mélange sérum humain-suspension de levures. Les résultats sont évalués en pourcentage d'activité restante, le 100 % étant l'activité témoin.

- 5 Les résultats rassemblés dans les tableaux A et B suivants et donnés à titre d'exemple ont été obtenus à partir de diverses levures des 3 familles Ascosporogènes, Cryptococcaceae et Sporobolomycetaceae et de leurs glucanes.

Tableau A : levures entières

10	Levures	5 mg/ml	10 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
	Wingea	25	12	10	-
	Debaryomyces	28	10	16	-
	Schizosaccharomyces	29	13	9	-
	Rhodospiridium	43	24	13	11
15	Cryptococcus	25	17	18	11
	Brettanomyces	27	15	15	8
	Torulopsis	24	16	13	10
	Rhodotorula	41	0	0	0

Tableau B : glucanes

20	Glucanes de	5 mg/ml	10 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
	Saccharomyces	30	14	11	-
	Wingea	31	12	16	-
	Debaryomyces	28	19	13	-
	Schizosaccharomyces	29	15	18	-
25	Rhodospiridium	35	29	16	17
	Cryptococcus	28	19	20	15
	Brettanomyces	33	17	17	12
	Torulopsis	27	18	14	19
	Rhodotorula	45	10	9	5

On constate d'après ces résultats que le complément a bien été absorbé en majeure partie par ces différentes levures et leurs extraits de glucanes, ce qui prouve leur activité immunostimulante.

5 2) Protection contre une injection expérimentale mortelle;
 traitement préventif.

Les animaux utilisés sont des souris SPF IFPA CREDO, femelles, de 18-20 grammes, nourries avant expérience durant 8 jours avec un régime dépourvu de levures mais contenant la dose de vitamines nécessaires et réparties en lots de 10 souris. Pour chaque expérience il y a un lot témoin d'infection et un lot infecté et traité soit par la levure soit par ses glucanes.

15 Dans ces expériences les souris ont été infectées par voie I.V. par environ 1×10^6 Staphylococcus aureus pathogènes (souche Institut Pasteur 54.146) ou par environ 1×10^4 Klebsiella pneumoniae.

 Le traitement a été effectué par voie I.P.
 - pour les levures à la dose de 50 mg/kg
20 - pour les glucanes à la dose de 10 mg/kg,
 sous forme de deux injections (jour -7 et jour -4) avant l'infection (jour 0), et le nombre de souris mortes dans chaque lot a été noté chaque jour.

25 Ces essais ont été effectués avec les mêmes levures que le test de consommation du complément (voir 1 ci-dessus) Dans les lots traités par les levures ou leurs glucanes on relève un pourcentage de souris mortes de 20 à 40 %, alors que dans le lot témoin non traité le pourcentage de
30 souris mortes était de 90 à 100 %.

Etant donné la virulence du germe injecté, la protection conférée par l'injection I.P. des levures ou de leurs glucanes est très importante. Cette protection est attribuable à une immunostimulation non spécifique.

Par ailleurs on a pu constater chez la souris infectée par Staphylococcus aureus la potentialisation d'un

antibiotique tel que la tétracycline par les glucanes des levures utilisables selon l'invention, notamment *Wingea* et *Rhodotorula*.

Les essais relatés ci-dessus ont mis en évidence ce que l'administration des levures appartenant aux familles des ascosporogènes, *sporobolomyceteceae* et *cryptococcaceae* ou de leurs glucanes, d'une part, diminue par immunostimulation non spécifique la mortalité d'animaux infectés par un germe pathogène et, d'autre part, potentialise l'action d'antibiotiques. Ces levures sont donc susceptibles d'être utilisées pour renforcer la résistance de l'organisme contre les agents infectieux et pour améliorer les défenses immunitaires.

Les levures utilisables selon l'invention et les glucanes qui en sont extraits étant dépourvus de toxicité peuvent donc être utilisés dans la prévention et/ou le traitement des maladies infectieuses aiguës ou chroniques, en particulier des maladies de la sphère ORL et/ou pulmonaire, mais aussi de toute autre maladie d'origine virale ou bactérienne. Leurs propriétés immunostimulantes non spécifiques permettent également d'envisager leur utilisation comme agents antitumoraux. Ils peuvent donc être utilisés comme médicaments seuls ou en association avec un ou plusieurs antigènes ou encore en association avec un ou plusieurs antibiotiques.

Les cellules entières des levures peuvent être administrées par voie orale à des doses quotidiennes de 100 à 2000 mg (produit sec) par jour, de préférence dans des gélules contenant les cellules lyophilisées et éventuellement des excipients usuels, ou bien en ampoules buvables, les cellules étant en suspension dans leur milieu de culture.

Exemple de composition d'une gélule :

	- Cellules lyophilisées de levure (p.ex. <i>Rhodotorula</i>)	50 mg
	- Lactose	7 mg
35	- Stéarate de magnésium	2 mg
	- Sucre glace q.s.p. une gélule de	150 mg

Les glucanes des levures peuvent aussi être administrées par voie orale, à des doses quotidiennes de 20 à 500 mg, ou seront utilisés également sous forme de suspensions injectables, à raison de 5 à 100 mg par jour. On peut aussi envisager l'usage des glucanes sous forme de crèmes dermiques ou d'aérosols.

Exemple de composition de suspension injectable :

	- Glucanes de Wingea micronisés	0,010 g
	- Polysorbate 80	0,025 g
10	- Polyvinylpyrrolidone	0,025 g
	- Phosphate monosodique	0,025 g
	- Chlorure de sodium q.s.p. isotonie merthiolate de sodium	0,0002 g
	- Eau distillée apyrogène q.s.p.	
15	1 ampoule injectable de 5 ml	

Exemple d'aérosol :

	- Glucanes micronisés *	0,050 g
	- Polysorbate 80	0,2 g
	- Glycérides oléiques polyoxyéthylènes	1 g
20	- Phosphate monosodique	0,1 g
	- Chlorure de sodium q.s.p. isotonie merthiolate de sodium	0,0008 g
	- Eau purifiée ...q.s.p.....	20 ml

25 * (particules < 50 µm dont 80 % < 10 µm)

REVENDICATIONS

- 1.- Médicament à base de levures ou de leurs extraits insolubles, caractérisé par le fait que ces levures appartiennent aux familles des ascosporogènes, des sporobolomycetaceae ou des cryptococcaceae, à l'exception des genres Saccharomyces, Pichia et Hansenula.
- 2.- Médicament selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est constitué de cellules entières de levures.
- 10 3.- Médicament selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il est constitué d'extraits insolubles de paroi de levures obtenus par un procédé consistant à éliminer des cellules de levures, les protéines, les lipides et les mannanes par traitement alcalin, puis le
15 glycogène et les glucanes solubles par traitement acide.
- 4.- Médicament à base d'extraits selon les revendications 1 ou 3, caractérisé par le fait que les extraits insolubles sont principalement constitués de glucanes.
- 20 5.- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que la levure appartient à la famille des ascosporogènes.
- 6.- Médicament selon la revendication 5, caractérisé par le fait que la levure appartient à la sous-
25 famille des saccharomycetaceae.
- 7.- Médicament à base de levures du genre Wingea ou de leurs glucanes.
- 8.- Médicament à base de levures du genre Debaromyces ou de leurs glucanes.
- 30 9.- Médicament à base de levures du genre Schizosaccharomyces ou de leurs glucanes.
- 10.- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que la levure appartient à la famille des sporobolomycetaceae.
- 35 11.- Médicament à base de levures du genre Rhodosporidium ou de leurs glucanes.

12.- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que la levure appartient à la famille des cryptococcaceae.

13.- Médicament selon la revendication 12, caractérisé par le fait que la levure appartient à la sous-famille des cryptococcoideae.

14.- Médicament à base de levures du genre *Cryptococcus*, *Toryloopsis* ou *Brettanomyces*, ou de leurs glucanes.

15.- Médicament à base de levures du genre *Rhodotorula* ou de leurs glucanes.

16.- Composition pharmaceutique renfermant à titre de substance active une levure ou ses extraits insolubles tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 15, ainsi qu'un véhicule pharmaceutique acceptable.